Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn)

Methodische Untersuchungen zur Darstellung der Delta-Aminolävulinsäuredehydratase (E.C. 4.2.1.24) - Phänotypen und Bestimmung der Genfrequenzen in einer westdeutschen Population (Raum Düsseldorf)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Elisabeth Juli

1985

UNIV. LEIDEN BIBL.

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Hopf

Referent
gez.: Prof. Dr. Röhrborn

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Schweitzer

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn)

Methodische Untersuchungen zur Darstellung der Delta-Aminolävulinsäuredehydratase (E.C. 4.2.1.24) - Phänotypen und Bestimmung der Genfrequenzen in einer westdeutschen Population (Raum Düsseldorf)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Elisabeth Juli

1985

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG 1

STÖRUNGEN DER δ-AMINOLÄVULINSÄUREDEHYDRATASE 2

MATERIAL UND METHODEN 6

ERGEBNISSE

1. Elektrophoretische Typen 8
2. Genfrequenzen 8
3. Einfluß der Aufarbeitungsmethoden des Hämolysates 10
4. Einfluß der Zusammensetzung des Inkubationspuffers 14
5. Alterungsversuche 14

DISKUSSION 17

ZUSAMMENFASSUNG 28

LITERATUR 29

ANHANG: REAGENZIEN 35

DANKSAGUNG 37

LEBENSLAUF 38

EINLEITUNG

Die δ-Aminolävulinsäuredehydratase (ALADH; E.C.4.2.1.24), auch unter dem Namen Porphobilinogensynthase bekannt, ist ein ubiquitär im Körper vorkommendes Enzym, dessen höchste Aktivität im blutbildenden System und in der Leber nachgewiesen werden kann. Untersuchungen von ANDERSON und DESNICK (1979) am isolierten Enzym zeigten, daß es aus acht offenbar identischen Untereinheiten von je 31000 daltons besteht. Das Enzym katalysiert die Kondensation von zwei Molekülen δ-Aminolävulinsäure (ALA) zu Porphobilinogen, der Pyrrolvorstufe der Porphyrine (GRANICK und MAUZERALL, 1958). Mit den Metallionen, die sie komplex binden können, stellen diese die prosthetische Gruppe vieler Proteine; als wichtigste seien genannt Hämoglobin, Myoglobin, mitochondriale und mikrosomale Cytochrome, Katalasen und Peroxidasen. BATTISTUZZI et al. beschrieben 1981 einen Polymorphismus der ALADH, dem die beiden kodominanten Allele $ALADH^1$ und $ALADH^2$ zugrunde liegen.

In der vorliegenden Arbeit wird über die Genfrequenzen der ALADH in einer westdeutschen Population (Raum Düsseldorf) berichtet. Weiterhin werden methodische Untersuchungen zum elektrophoretischen Nachweis der Isoenzyme dargestellt.

STÖRUNGEN DER δ-AMINOLÄVULISÄUREDEHYDRATASE

Am längsten bekannt ist der Aktivitätsverlust der δ-Aminolävulinsäuredehydratase im Rahmen einer Bleivergiftung. Schon früh nahm man eine Störung des Porphyrinstoffwechsels an, nachdem im Harn von Bleivergifteten vermehrt Porphyrine nachgewiesen worden waren (GROTEPASS, 1932; WATSON, 1936). RIMINGTON (zitiert nach KENCH, 1942) nahm 1938 eine Störung des Eiseneinbaus in das Protoporphyringerüst an. Aufgrund eingehenderer Untersuchung der Protoporphyrinausscheidung kamen KENCH et al. 1942 zu dem Schluß, daß die Porphyrinurie bei Bleivergifteten nicht allein auf den gestörten Eiseneinbau zurückzuführen sein kann. Auch stellten sie die Hypothese auf, daß eine Porphyrinbildungsstörung vorliegen müsse. De LANGEN und ten BERG wiesen 1948 nach, daß eine Coproporphyrinurie zuverlässiger und früher eine Bleivergiftung anzeigt als die basophile Tüpfelung der Erythrocyten. HAEGER-ARONSEN stellte 1960 eine erhöhte δ-Aminolävulinsäureausscheidung im Urin der Erkrankten fest. Im Jahre 1963 fanden LICHTMAN und FELDMAN eine reduzierte Aktivität der ALADH in den Erythrocyten von Patienten mit Bleivergiftung. Sie stellten weiterhin fest, daß diese Hemmung durch vorherige Inkubation der Erythrocyten mit Glutathion reversibel war. Daraus folgerten sie, daß Blei offenbar essentielle Sulfhydryl-

gruppen der ALADH inaktiviert. Daß die Schädigung der ALADH allerdings nicht der einzige Mechanismus sein kann, schlossen sie daraus, daß ein GSH-Zusatz zwar eine gesteigerte Porphobilinogensynthese, nicht aber eine Erhöhung der Porphyrinkonzentration zur Folge hatte. Seit diesen Entdeckungen setzt man die Bestimmung der ALA-Konzentration im Urin sowohl als Suchtest als auch zur Verlaufskontrolle bei Bleivergiftungen ein (SELANDER und CRAMER, 1970). Als sehr empfindlicher Test, der auch bei geringer Erhöhung des Blutbleispiegels genaue Aussagen zuläßt, wird die Bestimmung der Enzymaktivität der ALADH angewandt (HERNBERG et al., 1970).

Eine erhöhte Ausscheidung von ALA im Urin wird auch bei der hereditären Tyrosinämie beschrieben (GENTZ et al., 1969; STRIFE et al., 1977). Die Verbindung zwischen dem Tyrosinstoffwechsel und der Porphyrinbiosynthese war völlig unklar, bis 1977 LINDBLAD et al. im Harn ihrer Patienten massenspektrometrisch Succinylacetacetat nachwiesen. Diese Substanz ist normalerweise nicht als Stoffwechselprodukt bekannt. Den Untersuchern fiel ihre strukturelle Verwandtschaft mit Fumarylacetacetat und Maleylacetacetat auf. Dieses sind Metabolite im Tyrosinabbau. Da sie bei der Tyrosinämie nicht mehr zu Fumarat und Acetacetat abgebaut werden können, stauen sie sich an und können zu Succinylacetacetat reduziert werden. Succinylacetacetat jedoch ist in vitro ein potenter Inhibitor

der ALADH. Diese Hypothese könnte die erhöhte ALA-Ausscheidung erklären.

1979 wurde erstmals über eine erblich bedingte verminderte ALADH-Aktivität berichtet. BIRD et al. kamen aufgrund einer Familienuntersuchung zu dem Schluß, daß es sich um einen autosomal dominanten Erbgang handeln müsse. Die von ihnen untersuchten Personen zeigten eine um die Hälfte verminderte ALADH-Aktivität ohne jede klinische Symptomatik. Die Autoren vermuteten, daß - ähnlich wie die Barbiturate bei der akuten hepatischen Porphyrie - Blei als Trigger für porphyrische Symptome wirken könnte. DOSS et al. berichteten im gleichen Jahr über zwei junge männliche Patienten mit einem akuten hepatischen Porphyriesyndrom, dem eine erheblich verminderte ALADH-Aktivität (unter 1% der gesunden Normalpersonen) zugrunde lag. Gleichzeitig lagen eine erhöhte ALA- und Porphyrinausscheidung vor. Bleivergiftung und hereditäre Tyrosinämie konnten sicher ausgeschlossen werden. Die Untersuchung der Enzymaktivitäten bei den Familienangehörigen der Erkrankten ergab ebenfalls erniedrigte Werte. Der Vererbungsmodus blieb allerdings unklar. 1983 stellten DOSS et al. eine Hypothese des Erbganges der neuen Porphyrie auf. Sie nahmen für die verminderte ALADH-Aktivität bei den Familienangehörigen der Erkrankten ebenso wie BIRD et al. einen autosomal dominanten Erbgang an, während das Porphyriesyndrom offenbar rezessiv vererbt werde.

Es bleibt zu diskutieren, ob nicht eventuell Kodominanz der Allele vorliegt. In diesem Falle bewirkt das abnorme Allel bei Heterozygoten eine Aktivitätsminderung des Enzyms um die Hälfte, was zu keiner klinischen Ausfallserscheinumg führen muß, da die ALADH nicht den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Hämbiosynthese katalysiert und bei Normalpersonen im Überschuß vorhanden ist. Allerdings sind diese Personen, wie DOSS et al. in derselben Arbeit berichten, empfindlicher gegen Substanzen, die die ALADH hemmen (Blei, ALkohol). Liegt das abnorme Allel jedoch im homozygoten Zustand vor, so ist die Enzymaktivität derart drastisch vermindert, daß es auch ohne äußere Auslöser zur Ausprägung eines Porphyriesyndroms kommt.

MATERIAL UND METHODEN

Die Blutproben von 711 nicht verwandten Blutspendern des Düsseldorfer Raumes (Ausländer ausgenommen) wurden untersucht. Als Gerinnungshemmer diente EDTA. Die Erythrocyten wurden zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Ein Teil der Proben wurde in Verhältnis 1:2 mit 30millimolarer GSH-Lösung versetzt, die anderen Erythrocytensuspensionen wurden sofort ohne vorherige GSH-Behandlung im Eisbad sonifiziert. Allen Proben wurde Toluol zugesetzt. Das nach 10minütiger Zentrifugation (5000 Rpm) gewonnene Hämolysat wurde 1,5:1 mit Sephadex G 200 Superfine gemischt (30ml H_2O + 5g Saccharose + 1g Sephadex). Diese Aufarbeitung wurde bis auf wenige Ausnahmen am Tage der Blutentnahme vorgenommen.

Die horizontale Stärkegelelektrophorese (12,5% hydrolysierte Stärke) wurde modifiziert nach AMORIM et al. (1982) in einem diskontinuierlichen Puffersystem durchgeführt, bestehend aus einem Brückenpuffer: 1,13M NaOH, 0,4M Citronensäure-1-hydrat (pH 6) und einem Gelpuffer: 12,5mM NaOH, 26mM Histidinhydrochlorid (pH 6). 1,4l des mit Stärke aufgeschlämmten Gelpuffers wurden unter Rühren im Wasserbad auf 95°C erhitzt, bis die Lösung opaleszierte. Sie wurde zu einer 10x350x400mm großen Gelplatte gegossen. Im Abstand von 11cm von der kathodischen Seite des Gels wurde ein Elektrophoresenkamm eingesetzt, um 24 kleine Kammern à 0,1ml

zu erzeugen. Im folgenden wird diese Linie mit den Kammern als Startpunkt bezeichnet. 5V/cm Spannung wurden unter Kühlung auf 2°C für 15h angelegt. Danach wurde das Gel von unten nach oben in 2mm dicke Scheiben geschnitten. Die unterste Schicht (Bodenplatte) wurde verworfen, die darauf folgende Schicht (erste Schicht) wurde in allen Versuchen verwendet. Zur spezifischen Anfärbung wurde sie zwischen zwei Filterpapierblätter gelegt. Diese waren mit einem 0,1molaren Phophatpuffer getränkt, der 13mM ALAxHCl, 15mM GSH und 10mM $ZnCl_2$ enthielt. Das so behandelte Gel wurde auf eine Glasplatte gelegt, in Kunststoffolie eingewickelt und 3h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Gel kurz mit Leitungswasser abgespült und dann 15-30min. in einer modifizierten EHRLICH-Lösung gefärbt. Diese bestand aus 340ml Eisessig, 160ml Perchlorsäure (70%), H_2O ad 1000ml mit 0,13M Dimethylaminobenzaldehyd und 50mM $HgCl_2$. An den Orten mit ALADH-Aktivität kondensierten zwei Moleküle ALA zu Porphobilinogen, das mit dem EHRLICH-Reagenz (Dimethylaminobenzaldehyd) rötliche Banden ergab. Ließ man die EHRLICH-Lösung länger einwirken, so zeigte sich eine allmähliche Entfärbung der Banden.

Die Genfrequenzen wurden mit der Genzählmethode ermittelt.

ERGEBNISSE

1. Elektrophoretische Typen

Abb.1. zeigt die drei unterschiedlich weit gelaufenen Banden der einzelnen Phänotypen. Das Verteilungsmuster stimmt im wesentlichen mit dem von BATTISTUZZI et al. 1981 berichteten überein. Das Verhältnis zwischen der Laufstrecke von ALADH 1 und ALADH 2 beträgt 1:1,33, was einer etwas besseren Auftrennung als bei den Erstbeschreibern entspricht (1:1,22). Die Färbung der Banden ALADH 1 und ALADH 2 war etwas intensiver als die der ALADH 2-1-Bande, auch schien letztere etwas breiter zu sein als die der homozygoten Typen.

2. Genfrequenzen

Tab.1. zeigt die beobachteten und erwarteten Phänotyphäufigkeiten bei den 711 untersuchten Individuen und die sich daraus ergebenden Genfrequenzen.

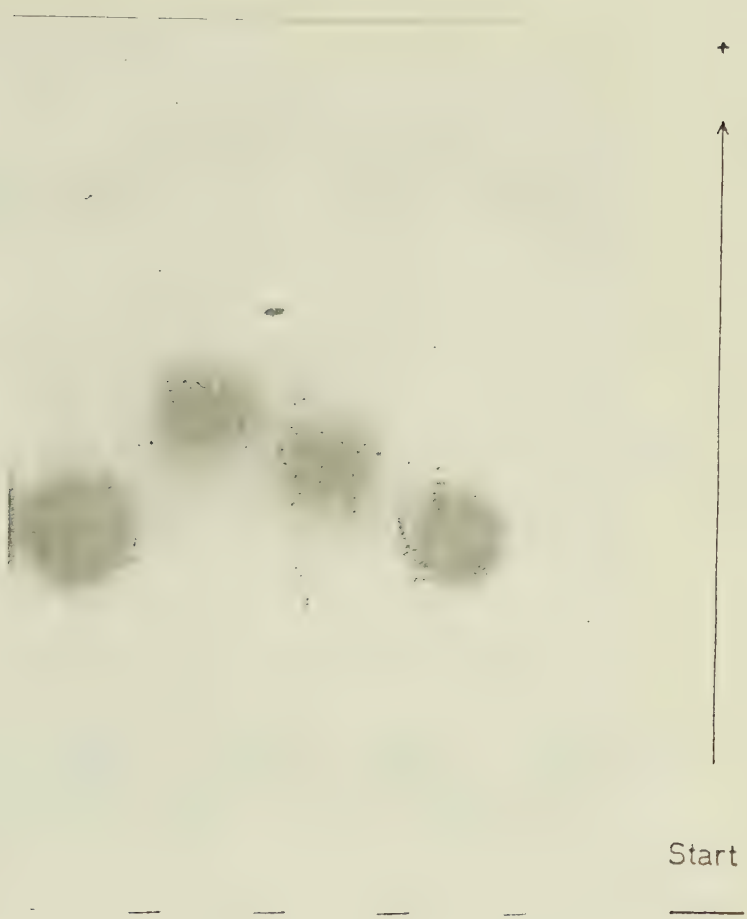


Abb.1. Phänotypen der ALADH nach Stärkegelelektrophorese

Tab.1. Beobachtungs- und Erwartungswerte für die Phänotyphäufigkeiten sowie die Genfrequenzen der ALADH in einer westdeutschen Population (Raum Düsseldorf)

Phänotyp	1	2-1	2	n
Beobachtet	614	93	4	711
Erwartet	613,6	93,8	3,6	711,0

$ALADH^1$: 0,929 $ALADH^2$: 0,071

3. Einfluß der Aufarbeitungsmethode des Hämolysates

Um den Einfluß von EDTA auf die Darstellung der Banden zu ermitteln, wurde von 14 Spendern je eine native Blutprobe und eine mit EDTA behandelte gewonnen. Die weitere Aufarbeitung war identisch. Abb.2. zeigt, daß kein Unterschied zwischen den resultierenden Banden besteht. Aus technischen Gründen wurde im weiteren Verlauf nur noch EDTA-Blut verwendet.

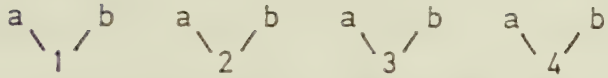


Abb.2. ALADH-Phänotypen 4 verschiedener Spender (1-4)

a: nach Verwendung von EDTA-Blut
b: nach Verwendung von Nativblut

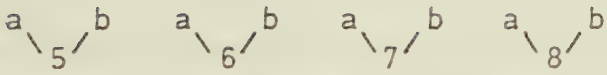
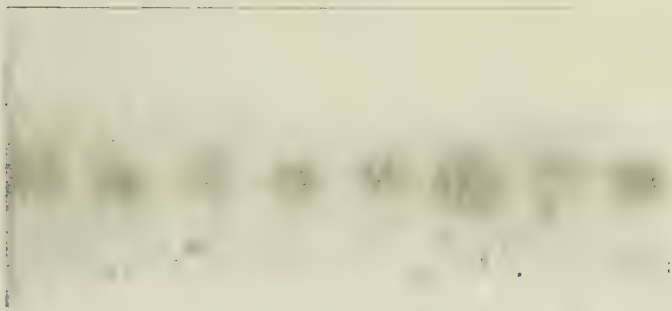


Abb.3. ALADH-Phänotypen 4 verschiedener Spender (5-8)

a: nach Aufarbeitung ohne Toluol
b: nach Aufarbeitung mit Toluol

Weiterhin wurde die Notwendigkeit einer Toluolbehandlung des gewaschenen Hämolysates geprüft. Nicht mit Toluol behandelte Proben wiesen nur verwaschene rötliche Schlieren auf, die keinem der beschriebenen Typen zugeordnet werden konnten. Gleichzeitig von denselben Spendern entnommene Proben wiesen mit Toluolbehandlung eindeutig identifizierbare Banden auf (vgl. Abb.3.)

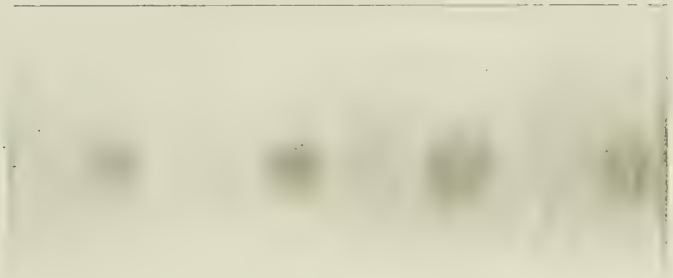
Schließlich stellte sich die Frage nach der Notwendigkeit eines GSH-Schutzes während der Aufarbeitung des Hämolysates (vgl. BATTISTUZZI et al., 1981). Proben derselben Spender wurden zur Hälfte mit einer 30millimolaren GSH-Lösung im Verhältnis 1:2 gemischt und danach sonifiziert. Die andere Hälfte wurde ohne GSH sofort sonifiziert. Unter der Voraussetzung, daß sich im Inkubationspuffer GSH befand, zeigten sich bei den mit GSH behandelten Proben gut ablesbare Banden, die allerdings etwas schwächer waren als die Banden der unbehandelten Proben (s. Abb.4.) Enthielt der Inkubationspuffer jedoch kein GSH, so ließen sich die Banden der GSH-behandelten Proben nicht mehr gut genug erkennen, um die Typen eindeutig zu bestimmen. Bei den unbehandelten Proben war dies im Gegensatz dazu noch einwandfrei möglich (s. Abb.5.)



a b a b a b a b
1 2 3 4

Abb.4. ALADH-Phänotypen 4 verschiedener Spender (1-4)
Inkubationspuffer mit GSH

a: nach Aufarbeitung des Hämolysates mit GSH
b: nach Aufarbeitung des Hämolysates ohne GSH



a b a b a b a b
1 2 3 4

Abb.5. ALADH-Phänotypen derselben Spender (1-4, wie Abb.4.)
Inkubationspuffer ohne GSH

a: nach Aufarbeitung des Hämolysates mit GSH
b: nach Aufarbeitung des Hämolysates ohne GSH

4. Einfluß der Zusammensetzung des Inkubationspuffers

Es wurde untersucht, ob neben dem Substrat δ-Aminolävulinsäure Zn^{2+} und GSH für eine gute Bandendarstellung unabdingbar sind. Dazu wurden ohne GSH aufgearbeitete Proben verwendet, die alle auch mit Toluol behandelt worden waren. Proben von sechs Spendern wurden geviertelt und jeweils auf vier Gele aufgeteilt. Jeweils die erste Schicht der Stärkegele wurde in verschiedenen Puffern inkubiert. Das erste Puffergemisch enthielt ALA, Zn^{2+} und GSH, das zweite ALA und Zn^{2+}, das dritte ALA und GSH, und das vierte schließlich enthielt nur noch ALA. Die Abb.6.a-d zeigen, daß die Anfärbung beim ersten Puffer am ausgeprägtesten war, etwas schwächer beim zweiten Gemisch, beim dritten erschienen nur noch sehr schwache Banden, und beim vierten Puffer waren gar keine Banden mehr sichtbar.

5. Alterungsversuche

Zur Klärung der Frage, wie lange noch ausreichend Enzymaktivität vorhanden ist, um eine Typenbestimmung vorzunehmen, wurden frische EDTA-Blutproben ohne GSH, jedoch mit Toluol aufgearbeitet und bei 4°C in luftdicht abgeschlossenen Plastikgefäßen aufbewahrt. Im Wochenabstand wurde je ein Aliquot dieses Hämolysates mit Sephadex versetzt und elektrophoretisch untersucht. Erst nach sechs Wochen verschwand die Ban-

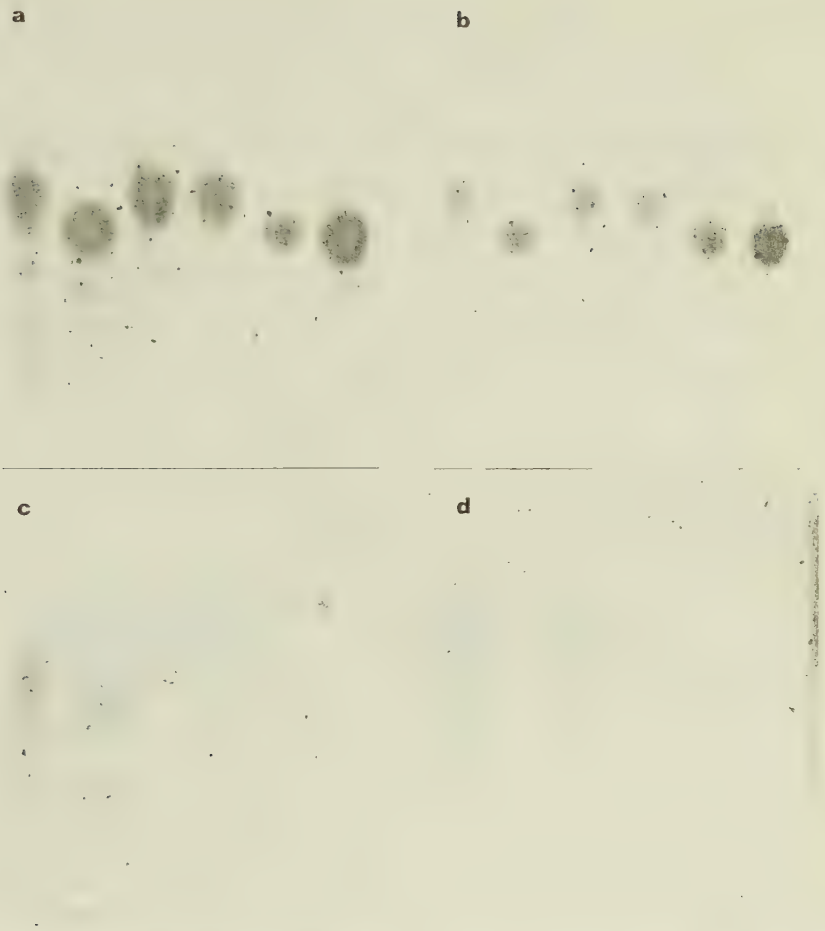


Abb.6. Einfluß der Zusammensetzung des Inkubationspuffers auf die Phänotypen der ALADH (nach Aufarbeitung ohne GSH)

a: Phosphatpuffer mit ALA, Zn^{2+} und GSH
b: Phosphatpuffer mit ALA und Zn^{2+}
c: Phosphatpuffer mit ALA und GSH
d: Phosphatpuffer mit ALA

Alle Abb.(a-d) bei gleicher Blende und Belichtungszeit aufgenommen und vergrößert.

de des Typs ALADH 2, während die Banden des Typs ALADH 1 noch gut erkennbar waren. Auffallend war, daß ab der dritten Woche unterhalb der üblichen Banden zusätzliche Banden auftauchten, die in allen weiteren Versuchen bestehen blieben (s. Abb.7.)

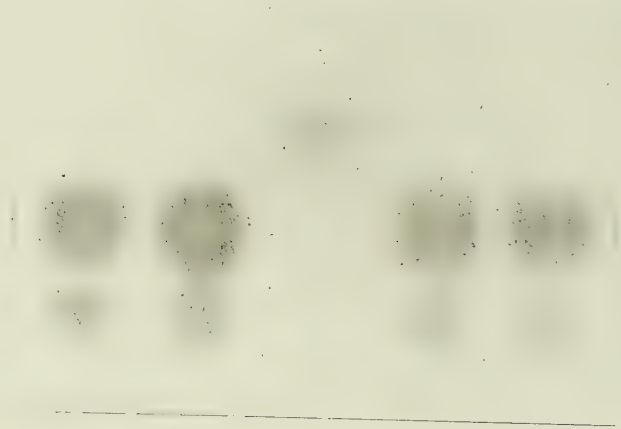


Abb.7. Auftreten zusätzlicher Banden nach 3 Wochen Lagerung bei 4°C

DISKUSSION

BATTISTUZZI et al. beschrieben 1981 diesen Polymorphismus der ALADH. Sie führten die elektrophoretisch beobachtbaren Typen auf zwei kodominante Allele zurück, $ALADH^1$ und $ALADH^2$. Die intermediäre Lage des heterozygoten Typs ALADH 2-1 erklärten sie mit der oktameren Struktur des Enzymmoleküls. Nach der Formel für die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Heteromeren bei zwei Ausprägungsmöglichkeiten

$$\binom{n}{k} \times p^k \times (1-p)^{n-k}$$

ergibt sich eine Häufigkeitsverteilung von 1:8:28:56:70:56:28:8:1 unter der Annahme, daß die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der beiden Ausprägungsmöglichkeiten gleich groß ist (das Produkt $p^k \times (1-p)^{n-k}$ ergäbe dann in allen Fällen p^n). Die sehr viel geringere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten homomerer Isoenzyme ist als Begründung dafür anzusehen, daß die intermediäre Bande nicht den gesamten Raum zwischen den Banden der Typen ALADH 1 und ALADH 2 einnimmt. Die eigentlich zu erwartenden neun Banden liegen zu nah beieinander, um einzeln unterschieden werden zu können. Bei genauerer Betrachtung erkennt man, daß die Bande des heterozygoten Typs ein wenig in Richtung auf die Bande des Typs ALADH 2 verschoben ist. Möglicherweise ist die Häufigkeit der beiden Ausprägungsmöglichkeiten doch nicht exakt gleich.

In diesem Falle wäre die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des Monomers, das durch das Allel ALADH^2 bestimmt wird, etwas höher als für das andere. Nach oben erwähnter Formel würde sich dann der Häufigkeitsgipfel zugunsten der mit häufigeren Monomeren gebildeten Heteromeren verschieben.

Abb.8. Graphische Darstellung der Heteromerenhäufigkeit, wenn die Wahrscheinlichkeit für die Bildung der beiden verschiedenen Monomere gleich groß ist (p= 1-p)

Die in Tab.1. aufgeführten Beobachtungswerte zeigen eine gute Obereinstimmung mit den Erwartungswerten, die sich unter Annahme von HARDY-WEINBERG-Bedingungen errechnen lassen.

Bereits 1958 entwarfen GRANICK und MAUZERALL das Grundkonzept des Reaktionsmechanismus der ALADH. Aufgrund ihrer enzymkinetischen Beobachtungen forderten sie ein Enzym, das die Pyrrolsynthese im wesentlichen in zwei Schritten katalysiert: Zunächst muß ein Molekül ALA eine feste Bindung mit dem katalytischen Zentrum des Enzyms eingehen, das zweite Molekül ALA kann sich dann an den Enzym-Substrat-

Komplex anlagern, und über eine Aldolkondensation wird unter Wasserabspaltung Porphobilinogen gebildet. Durch Untersuchung der ALADH von Rhodopseudomonas spheroides deckten NANDI und SHEMIN 1968 den exakten Reaktionsmechanismus auf (s. Abb.9.). Die Carbonylgruppe des ersten Moleküls ALA bildet mit einer Aminogruppe des katalytischen Zentrums eine Schiff'sche Base. Die Aminogruppe entstammt einem Lysinrest (BARNARD et al., 1977). Dadurch entsteht ein starkes Carbanion, das durch seine Nukleophilie die Carbonylgruppe des zweiten Moleküls ALA anlagert. Hierbei wird ein Molekül Wasser frei. Das entstehende Aldol spaltet ein zweites Molekül Wasser ab, die freie Aminogruppe des zweiten ALA-Moleküls ersetzt die Bindung an das Enzym, und der Pyrrolring ist geschlossen. BARNARD et al. wiesen 1977 auf die wesentliche Rolle zweier reduzierter Thiolgruppen am katalytischen Zentrum der ALADH hin. Sie sind wahrscheinlich für die sterische Konfiguration des Substratmoleküls verantwortlich. Desweiteren messen die Autoren ihnen eine Bedeutung beim letzten Schritt zum Ringschluß und der Abspaltung des Pyrrols bei. Von vielen Autoren wird beschrieben, daß Zn^{2+} die Aktivität der ALADH steigert (STRIFE et al., 1977; THOMASINO et al., 1977; ANDERSON und DESNICK, 1979; BEVAN, 1980; SASSA, 1982). BEVAN et al. fanden 1979, daß das Enzym die höchste Aktivität zeigte, wenn es vier Grammatom Zn^{2+} gebunden hatte. Sie vermuteten einen Zusammenhang des Zn^{2+} mit den Sulfhydrylgruppen des Cysteins am

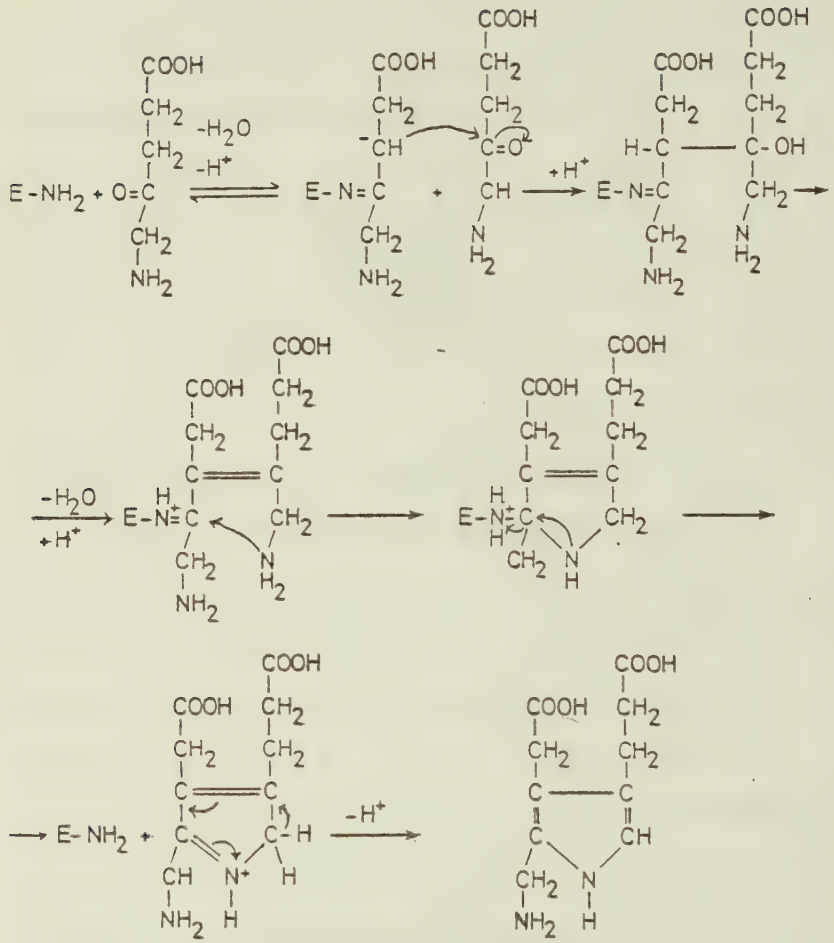


Abb.9. Reaktionsmechanismus der ALADH modifiziert nach NANDI und SHEMIN (1968)

(E≙ Enzym)

Reaktionszentrum der ALADH. Entweder öffnet die Reduktion einer Disulfidbrücke einen Kanal, durch den das Zinkion an seinen eigentlichen Bindungsort gelangt, oder Zn^{2+} bindet direkt an die reduzierten Thiolgruppen. Diese Notwendigkeit von Zinkionen erklärt auch die schon früh beobachtete Inaktivierbarkeit des Enzyms durch EDTA und andere Chelatbildner (GRANICK und MAUZERALL, 1958; ANDERSON und DESNICK, 1979; SASSA, 1982).

Trotz dieser häufig beobachteten Tatsache läßt sich für die elektrophoretische Untersuchung der ALADH durchaus Blut mit EDTA als Antikoagulans verwenden. Da die Erythrocyten zweimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen werden, dürfte sich nur noch extrem wenig freies EDTA in der Erythrocytensuspension befinden. Diese Menge jedoch fällt bei einer qualitativ bewertenden Methode wie der hier angewandten nicht ins Gewicht.

Der Schutz der essentiellen Thiolgruppen vor Oxidation während der Aufarbeitung des Hämolysates erwies sich als überflüssig, bisweilen sogar nachteilig. Offenbar reicht die physiologischerweise in den Erythrocyten vorhandene Glutathionmenge aus, um das Enzym über Wochen reaktionsfähig zu erhalten. Um eine bessere Aktivierung zu erhalten, empfiehlt sich allerdings ein GSH-Zusatz zum Inkubationspuffer. Daß die mit GSH aufgearbeiteten Proben schwächere Banden zeigten als die unbehandelten dürfte auf die Verdünnung mit GSH-Lösung (1:2) zurückzuführen sein. Die

so behandelten Proben bedurften einer maximalen Stimulierung mit Zn^{2+} und GSH im Inkubationspuffer. Unbehandelte Proben zeigten auch ohne Zn^{2+} resp. GSH gut ablesbare Banden. Allerdings waren sie empfindlicher gegen einen Mangel an Zinkionen als an GSH.

Der Vorteil einer Toluolbehandlung besteht vermutlich in einer Konzentration der wasserlöslichen Bestandteile des Hämolysates, zu denen auch das Enzym gehört. Der lipophile Zelldetritus sammelt sich in der Toluolphase an und kann dann verworfen werden.

Die nach dreiwöchiger Lagerung des aufgearbeiteten Hämolysates erscheinenden zusätzlichen Banden können als Alterungsphänomene gedeutet werden.

Die beschriebene allmähliche Entfärbung der Banden im Stärkegel kann nach MAUZERALL und GRANICK (1956) darauf zurückgeführt werden, daß ein weiteres Molekül Porphobilinogen mit dem Farbsalz (aus Dimethylaminobenzaldehyd und Porphobilinogen) zu einem ungefärbten Komplex weiterreagiert.

EIBERG et al. berichteten 1982 über die Kopplung des ABO-Systems mit dem ALADH-Polymorphismus. Der Genort liegt somit auf dem Chromosom 9, und zwar vermutlich in folgender Sequenz: ABO-AK1-ALADH-ORM. Die Lage auf diesem Chromosom wurde 1984 bestätigt von BEAUMONT et al. durch somatische Zellhybridisierung und spezifische Enzymimmunoassays.

Die hier untersuchte Stichprobe wurde zufällig erhoben und

zeigte keine Bevorzugung einer bestimmten Blutgruppe des ABO-Systems. Kopplungsphänomene sind somit praktisch ausgeschlossen.

Seit der Entdeckung des ALADH-Polymorphismus im Jahre 1981 sind verschiedene Populationen hinsichtlich der Genfrequenzen untersucht worden. In Tab.2. werden die Ergebnisse und Stichprobenumfänge dieser Studien mit den Daten der vorliegenden Arbeit verglichen.

BATTISTUZZI et al. (1981) untersuchten außer einer römischen Population mit 798 Individuen noch zwei weitere, eine in Tuscania (90 km nördlich von Rom) mit 70 Individuen und eine in Neapel mit 38 Individuen.

Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den drei festgestellten Genfrequenzen, die jedoch auch auf den erheblich geringeren Stichprobenumfang der Populationen aus Tuscania und Neapel zurückzuführen sein könnte.

BENKMANN et al. veröffentlichten 1983 eine Studie über drei verschiedene Populationen, eine deutsche, eine japanische und eine liberianische. Nähere Angaben über die Populationen wurden nicht gemacht. Auch hier waren die Unterschiede zwischen den Genfrequenzen signifikant, wobei allerdings wiederum nur eine geringe Zahl von Individuen untersucht worden war. GOEDDE et al. berichteten 1984 über die Genfrequenzen in einer 175 Individuen umfassenden Indianerpopulation der Atacamawüste. Die umfangreichste Untersuchung der Genfrequenzen der ALADH, die bislang vor-

Tab.2. Genfrequenzen der ALADH in einer westdeutschen Population im Vergleich mit anderen untersuchten Populationen

Untersuchte Population	ALADH^1	ALADH^2	n	Autoren
Europide				
Kopenhagen	0,9378	0,0622	1697	EIBERG et al., 1982
Deutschland				
Düsseldorfer Raum	0,929	0,071	711	Diese Arbeit
Deutschland	0,889	0,111	144	BENKMANN et al., 1983
Italien*	0,900	0,100	762	PETRUCCI et al., 1982
Rom	0,890	0,110	789	BATTISTUZZI et al., 1981
Tuscania	0,780	0,220	70	-"-
Neapel	0,830	0,170	38	-"-
Galicien	0,917	0,083	500	CAEIRO et al., 1985
Mongolide				
Japan	0,942	0,058	121	BENKMANN et al., 1983
Indianide				
Atacama Indianer	0,986	0,014	175	GOEDDE et al., 1984
Negride				
Liberia	1,000	-	296	BENKMANN et al., 1983

*enthält die Population von Tuscania

liegt, stammt von EIBERG et al. (1982) über eine dänische Population (Raum Kopenhagen). CAEIRO und REY teilten 1985 die Genfrequenzen einer galicischen Population von 500 Individuen mit. Die von PETRUCCI et al. 1982 angegebenen Genfrequenzen für Italien setzen sich aus den Daten sieben kleinerer Populationen (Stichprobenumfänge zwischen 71 und 153 Individuen) verschiedener italienischer Orte zusammen. Von den hier zitierten Arbeiten erscheinen nur die Untersuchungen in Kopenhagen, Rom, Galicien und Düsseldorf vergleichbar, da sie über große Stichprobenumfänge jeweils einer Population verfügen. Ein Vergleich mittels Chi-Quadrat-Test ergab signifikante Unterschiede zwischen den Genfrequenzen in Rom und Kopenhagen (χ^2=29,49) und denen in Rom und Düsseldorf (χ^2=11,22) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1%. Der Unterschied zwischen den Genfrequenzen in Düsseldorf und Kopenhagen war nicht signifikant (χ^2=1,30). Ebenso fand sich zwischen der Genfrequenz in Galicien und den übrigen drei Populationen kein signifikanter Unterschied (Rom-Galicien: χ^2=5,198; Kopenhagen-Galicien: χ^2=3.67; Düsseldorf-Galicien: χ^2=0,58).

Aus diesen Daten läßt sich für Europa ein Süd-Nord-Gefälle der Frequenz des Allels $ALADH^2$ annehmen, dessen Häufigkeit in Italien am größten ist und über Mitteleuropa nach Nordeuropa abzunehmen scheint. Statistisch signifikant unterschiedlich sind hierbei jedoch nur die Frequenzen nördlich

und südlich der Alpen, wohingegen sich dies für die Häufigkeiten in Mittel- und Nordeuropa nicht nachweisen läßt. Eine Mittelstellung nimmt die westeuropäische Population (Galicien) ein, die sich in das angenommene Gefälle nicht einordnen läßt und keine signifikanten Unterschiede zu den übrigen Populationen aufweist. Die bisher vorliegenden Untersuchungen an Nichteuropiden lassen noch keine verläßlichen Schlüsse auf die Verteilung der Genfrequenzen der ALADH in anderen Rassen zu. Es sind zu wenig Populationen (insgesamt drei), die ihrerseits auch einen zu geringen Stichprobenumfang aufweisen, um eine gesicherte Aussage über Unterschiede zu machen. Bemerkenswert jedoch erscheint die Tatsache, daß in der einzigen untersuchten negriden Population das $ALADH^2$-Allel nicht gefunden werden konnte. Ob der ALADH-Polymorphismus in der Tat bei Negriden fehlt, werden weitere Untersuchungen zeigen müssen.
Für den Vergleich verschiedener Populationen kann die ALADH zusammen mit den üblicherweise untersuchten Systemen von Bedeutung sein. Aufgrund der offenbar allgemein recht niedrigen Frequenz des Allels $ALADH^2$ sollte die Stichprobe möglichst groß gewählt werden. Um zu klareren Aussagen über Häufigkeit und Verteilung des Polymorphismus zu kommen, sind weitere Untersuchungen wünschenswert.
Für die Vaterschaftsbegutachtung ist die ALADH mit ihrer relativ geringen isolierten Vaterschaftsausschlußchance (AVACH) nur bedingt einsetzbar. In strittigen Fällen mag

dieser Polymorphismus jedoch weitere wertvolle Hinweise für oder gegen eine Vaterschaft geben.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Polymorphismus der δ-Aminolävulinsäuredehydratase (ALADH) wurde an 711 nicht verwandten Blutspendern des Düsseldorfer Raumes untersucht. Folgende Genfrequenzen konnten festgestellt werden: $ALADH_1$ 0,929, $ALADH^2$ 0,071. Eine kurze Darstellung der klinischen Bedeutung der Störungen des Enzyms wurde gegeben. Methodische Untersuchungen ergaben folgendes:

1. Die Verwendung von EDTA-Blut für die elektrophoretische Untersuchung der ALADH ist ohne weiteres möglich.
2. Der Zusatz von reduziertem Glutathion während der Aufarbeitung des Hämolysates ist überflüssig.
3. Eine Toluolbehandlung des Hämolysates ist unbedingt erforderlich.
4. Eine optimale Darstellung der Banden läßt sich mit einem Inkubationspuffer erzielen, der δ-Aminolävulinsäure, Zn^{2+} und reduziertes Glutathion enthält.
5. Die Lagerung des aufgearbeiteten Hämolysates bei 4°C ist bis zu fünf Wochen möglich.

Abschließend wird ein vergleichender Überblick über die bisher veröffentlichten Genfrequenzen der ALADH in verschiedenen Populationen gegeben.

LITERATUR

AMORIM, A., KÖMPF, J., SCHUNTER, F., and RITTER, H. (1982): Aminolevulinate dehydratase (E.C.4.2.1.24): Linkage analysis. Hum. Genet. 61, 48-49

ANDERSON, P.M. and DESNICK, R.J. (1979): Purification and properties of δ-aminolevulinate dehydrase from human erythrocytes. J. Biol. Chem. 254, 6924-6930

BARNARD, G.F., ITOH, R., HOHBERGER, L.H., and SHEMIN, D. (1977): Mechanism of porphobilinogen synthase; possible role of essential thiol groups. J. Biol. Chem. 252, 8965-8974

BATTISTUZZI, G., PETRUCCI, R., SILVAGNI, L., URBANI, F.R., and CAIOLA, S. (1981): δ-aminolevulinate dehydrase: a new genetic polymorphism in man. Ann. Hum. Genet. 45, 223-229

BEAUMONT, C., FOUBERT, C., GRANDCHAMP, B., WEIL, D., VAN CONG N'GUYEN, GROSS, M.S., and NORDMANN, Y. (1984): Assignment of the human gene for δ-aminolevulinate dehydrase to chromosome 9 by somatic cell hybridization and specific enzyme immunoassay

BENKMANN, H.G., BOGDANSKI, P., GOEDDE, H.W. (1983): Polymorphism of delta-aminolevulinic acid dehydratase in various populations. Hum. Hered. 33, 62-64

BEVAN, D.R., BODLAENDER, P., and SHEMIN, D. (1980): Mechanism of porphobilinogen synthase; requirement of Zn^{2+} for enzyme activity. J. Biol. Chem. 255, 2030-2035

BIRD, T.D., HAMERNYIK, P., NUTTER, J.Y., and LABBE, R.F. (1979): Inherited deficiency of delta-aminolevulinic acid dehydratase. Am. J. Hum. Genet. 31, 662-668

CAEIRO, B. and REY, D. (1985): Genetic heterogeneity of delta-aminolevulinate dehydrase and phosphoglycolate phosphatase in north-west spain. Hum. Hered. 35, 21-24

DOSS, M., TIEPERMANN, R. von, SCHNEIDER, J., and SCHMID, H. (1979): New type of hepatic porphyria with porphobilinogen synthase defect and intermittend acute clinical manifestation. Klin. Wschr. 57, 1123-1127

DOSS, M., TIEPERMANN, R.V., and SCHNEIDER, J. (1983): Porphobilinogen-synthase (-aminolevulinic acid dehydratase) deficiency in bone marrow cells of two patients with porphobilinogen-synthase defect acute porphyria

EIBERG, H., MOHR, J., and STAUB NIELSEN, L. (1983): δ-aminolevulinatedehydrase : syteny with ABO-AK1-ORM (and assignment to chromosome 9). Clin. Genet. 23, 150-154

GENTZ, J., JOHANSSON, S., LINDBLAD, B., LINDSTEDT, S., and ZETTERSTRÖM, R. (1969): Excretion of δ-aminolevulinic acid in hereditary tyrosinemia. Clin. Chim. Acta 23, 257-263

GENTZ, J., LINDBLAD, B., LINDSTEDT, S., and ZETTERSTRÖM, R. (1970): Excretion of cathecholamines and delta-aminolevulinic acid in hereditary tyrosinemia. Pediat. Res. 4, 216

GOEDDE, H.W., ROTHHAMMER, F., BENKMANN, H.G., and BOGDANSKI, P. (1984): Ecogenetic studies in atacameno indians. Hum. Genet. 67, 343-346

GRANICK, S. and MAUZERALL, D. (1958): Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. II. Enzymes converting δ-aminolevulinic acid to coproporphyrinogen. J. Biol. Chem. 232, 1119-1140

GROTEPASS, W. (1932): Zur Kenntnis des im Harn auftretenden Porphyrins bei Bleivergiftung. Z. f. physiol. Chem. 205, 193-197

HAEGER-ARONSEN, B. (1960): Studies on urinary excretion of δ-aminolevulinic acid and other haem precursors in lead workers and lead-intoxicated rabbits. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 12, Suppl. 47

HERNBERG, S., NIKKANEN, J., MELLIN, G., and LILIUS, H. (1970): δ-aminolevulinic acid dehydrase as a measure of lead exposure. Arch. Environ. Health 21, 140-145

KENCH J.E., GILLAM, A.E., and LANE, R.E. (1942): Haemopoiesis in lead poisoning. Biochem. J. 36, 384-388

LAMON, J.M., FRYKHOLM, B.C., and TSCHUDY, D.P. (1978): Tyrosinemia with aminolevulinic acid dehydratase deficiency. J. Pediat. 92, 346

LANGEN, C.D. de and BERG, J.A.G. ten (1948): Porphyrin in the urine as a first symptom of leadpoisoning. Acta Med. Scand. 130, 37-44

LICHTMAN, H.C. and FELDMAN, F. (1963): In vitro pyrrole and porphyrin synthesis in lead poisoning and iron deficiency. J. Clin. Invest. 42, 830-839

LINDBLAD, B., LINDSTEDT, S., and STEEN, G. (1977): On the enzymic defects in hereditary tyrosinemia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4641-4645

MAUZERALL, D. and GRANICK, S. (1956): The occurrence and determination of δ-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. J. Biol. Chem. 219, 435-446

NANDI, D.L. and SHEMIN, D. (1968): δ-aminolevulinic acid dehydratase of Rhodopseudomonas spheroides. III. Mechanism of porphobilinogen synthesis. J. Biol. Chem. 243, 1236-1242

PETRUCCI, R., LEONARDI, A., and BATTISTUZZI, G. (1982): The genetic polymorphism of δ-aminolevulinate dehydrase in Italy. Hum. Genet. 60, 289-290

RIMINGTON, C. (1938): An enzymic theory of hemopoiesis. C.R.Lab. Carlsberg (Série chimique) 22, 454-464

SASSA, S. (1982): Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. Enzyme 28, 133-145

SELANDER, S. and CRAMER, K. (1970): Interrelationships between lead in blood, lead in urine, and ALA in urine during lead work. Brit. J. Indust. Med. 27, 28-39

STRIFE, C.F., ZUROWESTE, E.L., EMMETT, E.A., FINELLI, V.N., PETERING, H.G., and BERRY, H.K. (1977): Tyrosinemia with acute intermittent porphyria: Aminolevulinic acid dehydratase deficiency related to elevated urinary aminolevulinic acid levels. J. Pediat. 90, 400-404

THOMASINO, J.A., ZUROWESTE, E., BROOKS, S.M., PETERING, H.G., LERNER, S.I., and FINELLI, V.N. (1977): Lead, zinc, and erythrocyte δ-aminolevulinic acid dehydratase: Relationships in lead toxicity. Arch. Environ. Health 35, 244-247

WATSON, C.J. (1936): Concerning the naturally occurring porphyrins. IV. The urinary porphyrin in lead poisoning as contrasted with that excreted normally and in other diseases. J. Clin. Invest. 15, 327-334

ANHANG: REAGENZIEN

δ-Aminolävulinsäure

Serva, Best.-Nr. 12962

Citronensäure-1-hydrat

Merck, Art. 242

Dimethylaminobenzaldehyd

Serva, Best.-Nr. 20150

Essigsäure, reinst (mind. 96%)

Merck, Art. 58

Filterpapier

-Brücke: Schleicher&Schüll Nr. 0857

-Inkubation: Schleicher&Schüll Nr. 2316/8

Glutathion, reduziert

Boehringer, Best.-Nr. 15133 PGAA

$HgCl_2$

Merck, Art. 4417

L-Histidinmonohydrochlorid

Merck, Art. 4354

NaCl-Lösung, 0,9%

Boehringer, Best.-Nr. 15870

$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$

Merck, Art. 6580

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$

Merck,Art. 6346

Natriumhydroxidplätzchen

Merck, Art. 6482

Perchlorsäure, etwa 70%

Merck, Art. 519

Saccharose

Merck, Art. 7653

Sephadex G 200 Superfine

Pharmacia Fine Chemicals

Stärke, hydrolysiert, nach SMITHIES

Carl Roth KG 2-9480

Toluol

Merck, Art. 8325

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. G. R ö h r b o r n danke ich für die Überlassung des Themas und die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut.

Herrn Dr. H.-G. S c h e i l gilt mein besonderer Dank für seine anregende Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. H.T. B r ü s t e r, Institut für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin der Universität Düsseldorf, möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Untersuchungsmaterials danken.

Frau Dipl.-Biol. A. G ü n t h e r und Herrn cand. rer. nat. J. K o r n e l y, tätig am hiesigen Institut, möchte ich herzlich für ihre technischen Hilfen danken.

LEBENSLAUF

NAME:	Juli, Elisabeth Anna
GEBURTSDATUM:	23.07.1959
GEBURTSORT:	Wanne-Eickel, jetzt Herne
ELTERN:	Heinrich Juli, kaufm. Angestellter
	Margaretha Juli, geb. Schulte
STAATSANGEHÖRIGKEIT:	deutsch
KONFESSION:	römisch-katholisch
STAND:	ledig
SCHULBILDUNG:	1966-1969 Goethe-Schiller-Grundschule Wanne-Eickel
	1969-1978 Neusprachliches Mädchengymnasium der Stadt Wanne-Eickel
	Juni 1978 Abitur
STUDIUM:	WS 1978/79 Beginn des Medizinstudiums an der Universität Düsseldorf
	Januar 1983 Beginn der Bearbeitung des Dissertationsthemas
	Mai 1985 Bestehen des dritten Teils der Ärztlichen Prüfung